



Title	齲蝕罹患象牙質における糖化最終産物（AGEs）蓄積の 多面的解析
Author(s)	松田, 祐輔
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61671
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

齲蝕罹患象牙質における

糖化最終産物（AGEs）蓄積の多面的解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

平成29年3月

松田 祐輔

目次

1	序論	3
1.1	齲蝕	3
1.2	糖化最終産物 (Advanced Glycation End-products)	4
1.3	AGEs 蓄積の影響	5
2	材料と方法	7
2.1	グラム染色・免疫組織化学染色	7
2.2	免疫電子顕微鏡解析	8
2.3	ウエスタンブロット法による AGEs 化コラーゲンの検出	9
2.4	ELISA (Enzyme-ImmunoSorbent Assay) による AGEs 蓄積量の比較	11
2.5	高速液体クロマトグラフィーによる AGEs の検出・同定	12
2.6	齲蝕罹患象牙質の蛍光特性	13
3	結果	13
3.1	グラム染色・免疫組織化学染色	13
3.2	免疫電子顕微鏡解析	14
3.3	ウエスタンブロット法	14
3.4	ELISA	15
3.5	高速液体クロマトグラフィー	15
3.6	蛍光強度・蛍光寿命測定	15
4	考察	16
4.1	AGEs の分布	16
4.2	AGEs の検出・同定	17
4.3	齲蝕罹患象牙質の蛍光特性	20
4.4	今後の展望	22
5	結論	23
6	謝辞	24
7	参考文献	25
8	図表	29

1 序論

1.1 齲蝕

歯は、歯髄とそれを覆う象牙質、エナメル質により構成されている。エナメル質は、歯冠の最表層に存在し、重量比 96%がヒドロキシアパタイト(以下 HA)を中心とした無機質で構成された生体で最も硬い組織である。象牙質は歯髄を覆い、歯冠部ではエナメル質の内層にある。象牙質には直径 0.8~2.2 μ m の象牙細管がエナメル象牙境から歯髄まで交通しており、細管内部を歯髄方向から細管内液が流れている。また、象牙質の組成は、約 70%が HA を中心とした無機成分、約 20%が有機成分、そして残りが水分である。象牙質に含まれている有機成分については、約 90%は type1 コラーゲンにより構成されている [1]。

齲蝕は、歯質を破壊する代表的な疾患の一つであり、我が国においても成人の 8 割以上が罹患、または治療の経験を持っている [2]。齲蝕発生の機序として、まず歯の表面に付着した細菌(*S.mutans* など)が糖を代謝し歯面に不溶性グルカンを合成し定着する。グルカン内で糖が分解されることにより乳酸、酢酸といった有機酸が産生され、それらの酸が歯質を脱灰することで構造の破壊が起こる [3]。歯は、発生から脱落まで代謝が起こらない組織の一つであり、齲蝕により大きく破壊されても、その構造を再生する機構を持たない。また、加齢に伴う構造の変化や物質の蓄積についても原則的に不可逆的な方向に進むという特徴がある [4]。齲蝕の進行について、臨床的には、若年者の齲蝕は進行が速く穿通性に拡大し、高齢者の齲蝕は進行が遅く穿下性に拡大する傾向がある [1]。また、エナメル質に限

局した初期の齲蝕については、フッ化物の応用で縮小・治癒させる再石灰化が見込めるとされているが [5]、象牙質まで進行した齲蝕については不可逆的であり、切削による齲蝕罹患部の除去および人工材料による充填・補綴が必要となる [1]。

1.2 糖化最終産物 (Advanced Glycation End-products)

糖化反応とは、タンパク質のアミノ基と還元糖が非酵素的に反応することであり、発見者にちなんでメイラード反応 (Maillard 反応) として知られている [6]。還元糖と反応したタンパク質が酸化、脱水、縮合などを経て最終的に生成される非常に安定した物質のことを糖化最終産物 (Advanced Glycation End products: 以下 AGEs) という [7] [8]。AGEs は、構造の違いから数十種類以上が報告されており、コラーゲン間の架橋構造を形成する架橋型 AGEs と添加する付加型 AGEs、また蛍光性の有無にて分類されている。それぞれの AGEs についてどのような作用があるかなど不明な点は多いが、糖化反応の評価を行う上で架橋型ではイミダゾピリジニウム環を有するペントシジン(pentosidine) [9]やクロスリンが、付加型ではタンパク質のリジン残基とグリオキサールやグリコールアルデヒドとの反応により生成されるカルボキシメチルリジン (以下 CML) [10]やカルボキシエチルリジン (以下 CEL) などがよく知られている。ペントシジンや CML は形成されやすく酸加水分解によっても安定しており、特にペントシジンは、イミダゾピリジニウム環が蛍光性を示すことから糖化反応の指標として定量、比較などに用いられている [11]。

1.3 AGEs 蓄積の影響

糖化によってコラーゲン分子に無秩序な架橋構造が形成され、蓄積すると、コラーゲンの伸展性は低下し、脆弱化が起こる。その結果、皮膚では硬化や皺、たるみなどが現れ [12]、骨では骨折しやすくなるといった変化が生じる [13] [14]。コラーゲンのように代謝の遅い生体内タンパク質では、加齢とともに様々な部位で糖化反応による AGEs の蓄積が起こる。このことから昨今、AGEs の蓄積は老化に伴う組織変化の主要な原因の一つとして考えられている [15] [16]。

AGEs は様々な疾患の診断に用いられるが、その一つとして糖尿病の診断基準グリコヘモグロビン（以下 HbA1c）が挙げられる [17] [18]。HbA1c は赤血球中のヘモグロビンがブドウ糖と結合している割合を示しており、血液検査までの 1~2 か月の平均血糖値の目安として利用されている。AGEs はグルコースとの反応により非酵素的に生成されることから、糖尿病患者のように高血糖状態が長期間継続すると、赤血球における糖化反応が促進され AGEs が多く蓄積する。また、糖尿病患者では長期間の高血糖状態により、動脈硬化や網膜の加齢変性といった加齢により増加する疾患が見られ、健常者より老化が進んでいる状態であると考えられる。糖尿病以外の疾患との関連として AGEs はアルツハイマー症の発症 [19]、腫瘍の転移などにも関与していることが報告されている [15]。

歯科分野での AGEs の影響としては、歯髄腔における異所性石灰化が報告されている [20]ほか、加齢に伴う象牙質コラーゲンへの AGEs 蓄積と破折様相の変化が報告されている

[21]。また、加齢に伴う象牙質コラーゲンへの AGEs の蓄積は、蛍光寿命が若年者に比べ高齢者の象牙質で顕著に短くなっていることで明らかとなっている [22]。

AGEs と齲蝕の関連について Kleter らは、齲蝕罹患象牙質において AGEs の蓄積を認めると報告している [23]。さらに、齲蝕の特徴である象牙質の褐色化についても AGEs と関連がある可能性が高いと述べている [24]。その一方で、齲蝕罹患に伴う AGEs 蓄積の分布状況に関する報告はない。

我々の研究室では、加齢に伴う象牙質への AGEs 蓄積について、形態学的手法、生化学的手法、そして蛍光寿命測定による検討を行ってきた。健全歯では AGEs は歯髄側より蓄積され、加齢とともに次第にエナメル象牙境側への蓄積が増加していることが明らかとなった [25]。我々は齲蝕に伴う象牙質コラーゲンへの AGEs 蓄積の仮説として、エナメル質を失い口腔内へ暴露した象牙質コラーゲンが、食物に由来する還元糖との間で糖化反応を起こし、AGEs が蓄積していくのではないかと考えた。本研究では、齲蝕の進行と AGEs の発現部位の関連性、AGEs 沈着に伴う蛍光寿命の変化、AGEs が齲蝕の進行に与える影響を調べることを目的とした。なお、皮膚などの糖化の程度の評価には架橋型 AGEs のペントシジンおよび付加型 AGEs の CML が一般的に利用されている。Kleter らによる齲蝕罹患象牙質における AGEs の評価実験でもペントシジンと CML が用いられており [23]、本研究もこの 2 種類について実験を行った。

2 材料と方法

本実験は大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会の審査を受けて承認（承認番号 H24-E25-1）を得た。歯科医学的見地から抜歯適応と診断された歯を持つ患者に、実験の目的と方法を説明し了承を得た上で抜去を行った歯を使用した。

また、加齢に伴う AGEs 蓄積の影響を少なくするため、抜歯時の年齢が 30 歳未満の者の歯で、根管治療をはじめとする一切の治療行為が行われていないものを使用した。

2.1 グラム染色・免疫組織化学染色

齲蝕罹患歯を低速ダイヤモンドソー（MC201、マルトー、東京）にて 1mm 厚にスライスカットし、10%EDTA（pH7.4）に 2 週間室温で浸漬して脱灰を行った。脱灰後 2 %パラホルムアルデヒド（以下 PFA）にて固定処理を行い、エタノール上昇系列で脱水し、パラフィン包埋を行った。回転式マイクローム（RM2125RT、LEIKA、Germany）を用いて、厚さ 4 μ m の準超薄連続切片を作製した [25]。採取した連続切片をグラム染色と免疫組織化学染色に用いた。

切片内のグラム細菌の分布を調べるため、グラム染色を行った。各切片をキシレンにて脱パラフィン後、グラム染色キット（111885、Merck、Germany）を用いて染色を行い、光学顕微鏡（CX41、OLYMPUS、東京）で染色像を観察した。

AGEs の分布状況およびコラーゲンの状況を観察するため、2 種類の抗体で免疫組織化学

染色を行った。グラム染色と同様に各切片の脱パラフィン後、トリス緩衝生理食塩水 (Tris-Buffered Saline: 以下 TBS) で洗浄した。ブロッキング (AE-1475 EzBlock Chemi、ATTO、大阪) 後、AGEs の分布状況の観察には一次抗体に抗 CML マウスモノクローナル抗体 (anti-CML mouse monoclonal antibody : 6D12、Transgenic Inc.、福岡)、二次抗体にビオチン標識ラビット抗マウス抗体 (Biotinylated rabbit anti-mouse IgG、DAKO Cytomation、Denmark)を使用した。コラーゲンの状況の観察には、一次抗体に抗 typeI コラーゲンポリクローナル抗体 (Polyclonal Antibody to Collagen type I-purified、Acris Antibodies Inc.、USA) を用い。二次抗体にビオチン標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) を用いた。抗原抗体反応後、ジアミノベンジジン (3,3'-Diaminobenzidine: 以下 DAB) にて発色反応を行い、光学顕微鏡 (CX41、OLYMPUS、東京) で染色像を観察した。

2.2 免疫電子顕微鏡解析

1mm 厚に切断した齶蝕罹患歯を EDTA で脱灰し、4%PFA と 0.5%グルタルアルデヒド (以下 GA) で固定した。視診にて歯質が黒く変色している部位を【齶蝕罹患部】、歯質の変色が起こっていない部位を【健全部】、そしてその中間部分を【境界部】とし、それぞれの部位から 1×1mm のブロックを 4 つずつ採取した。健全部の採取は、歯髄由来の AGE

s の沈着を考慮してなるべく歯冠部歯髄から離れた位置より採取した。それぞれのブロックについてエタノール上昇系列にて脱水後、低温紫外線重合レジン (LR-Gold resin、London Resin Compamy LTD.、UK) に浸漬し、-30℃で紫外線重合装置 (TUV200、Dosaka EM CO. LTD.、京都) を用いて 24 時間紫外線照射し、樹脂包埋を行った。樹脂硬化後、ウルトラミクロトーム (Ultratome V、LKB、Sweden)、ダイヤモンドナイフ (ナノトーム、酒井電子顕微鏡応用研究所、埼玉) を用いて 90nm 厚の超薄切切片を作製した。切片はニッケルグリッド (VECO グリッド #100、VECO、Nederland) にマウントし、TBS にて洗浄を行った。ブロッキングはロバ血清 (1/10 希釈) にて行い、抗 CML マウスモノクローナル抗体 (Clone No. 6D12; transgenic inc., Japan) を 1/100 希釈 (TBS、0.2% tween20、5% albumin) したものと 4℃、12 時間反応させた。2 次抗体には金コロイド標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (Donkey anti-mouse IgG antibody gold conjugate : ϕ 18nm、Jackson、USA) を 1/10 希釈したものを用いた。反応後、2%GA で固定処理を行い、2%酢酸ウランにて染色し、透過型電子顕微鏡 (H800、日立ハイテクノロジーズ、東京) で加速電圧 200kV にて観察を行った。各試料における金コロイド粒子の分布を観察した [26]。

2.3 ウェスタンブロット法による AGEs 化コラーゲンの検出

1mm 厚に切った齲蝕罹患歯を、10% EDTA (pH7.4) に 2 週間室温で浸漬し脱灰を行った。脱灰後の切片から齲蝕罹患部および健全部の直径 1mm の象牙質試料を採取し 1M-HCl を

100 μ l 加え、37℃にて 24 時間反応させた [27] [28]。反応後、それぞれの試料に含まれるタンパク質成分を TCA/アセトン沈殿法 [29]にて回収した。

タンパク質の分離を行うため、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を Laemmli 法で行った [30]。象牙質抽出物をリン酸緩衝液 (以下: PBS)、SDS-PAGE 用サンプルバッファー ($\times 1$ 濃度) に再溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル (ミニプロテアン TGX ゲル 4-15% グラディエントゲル、Bio-rad、CA) に 1 レーンあたり 15 μ l をロードした。電源装置 (パワーパック HC、Bio-rad、CA) にて 200mV 定電圧、約 30 分間電気泳動し、ダイフロン트가基準線に到達した時点で電気泳動を止めた。電気泳動後、ゲルは総タンパク質の検出のため銀染色、または AGEs およびコラーゲンの検出を行うためウエスタンブロット法を行った。

銀染色では電気泳動したゲルを 10%酢酸-50%メタノール-40%水で固定した後、銀染色試薬 (2D-銀染色試薬・II、コスモバイオ、東京) を用いて染色を行った [31]。

ウエスタンブロット法ではセミドライブロット法にてゲルより PVDF 膜へ転写を行った。陽極液に 15%メタノールを含む Tris60mM/CAPS40mM 緩衝液 pH9.0 を、陰極液に 0.1% SDS を含む Tris60mM/CAPS40mM 緩衝液 pH9.0 を使用した [32]。両緩衝液それぞれに、転写を行うゲルと同じ大きさの厚手の濾紙 (ブロットアブソorbent フィルターペーパー 極厚 2.45mm、Bio-rad、CA) を染み込ませた。また、陽極液にはあらかじめ 100%メタノールで親水化処理を行った PVDF 膜 (イミュンブロット PVDF メンブレン、

Bio-rad、CA) を、陰極液にはゲルを浸した。フィルターにゲルと PVDF 膜を密着させて挟み込み、 $1.5\text{mA}/\text{cm}^2$ の定電流で 1 時間、電源装置 (パワーパック HC、Bio-rad、CA) で転写を行った。転写後のゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色し、転写効率を確認した [33]。

タンパク質を転写した PVDF 膜はブロッキング試薬 (EzBlock Chemi ATTO、東京) でブロッキングを行った。AGEs の抗原抗体反応にはブロッキング液で 1/5000 希釈した抗 AGEs 抗体 (anti-CML mouse monoclonal antibody : 6D12、Transgenic Inc.、福岡) を一次抗体に、ヒツジ抗マウス抗体 (HRP-sheep anti-mouse IgG、Jackson、PA) をブロッキング液で 1/5000 希釈したものを二次抗体として反応させた。コラーゲンの抗原抗体反応には一次抗体に 1/5000 希釈したウサギ抗コラーゲン抗体 (Polyclonal Antibody to Collagen type I-purified、Acris Antibodies Inc.、USA) を、二次抗体に 1/5000 希釈したヤギ抗ウサギ抗体 (HRP-goat anti-rabbit IgG、Jackson Inc.、PA) を反応させた。

検出は化学発光 (ECL 発光 : Ez West Lumi plus、ATTO、東京) を用い、化学発光検出装置 (Gene Genome 5、Syngene、UK) を使用した。

2.4 ELISA (Enzyme-ImmunoSorbent Assay) による AGEs 蓄積量の比較

ウェスタンブロット法と同様に 1mm 厚の脱灰された齲蝕罹患歯を用意した。本実験では 3 本の齲蝕罹患歯 (23 歳、24 歳、25 歳) に対して 23 歳と 25 歳の齲蝕罹患歯に関しては 3

か所ずつ、24 歳の齲蝕罹患歯については 2 か所ずつ齲蝕罹患部と健全部を直径 1mm の試料を採取した。試料を硬質ガラス試験管に入れ、それぞれ 6M-HCl を 100 μ l 加え、試験管を減圧下封管し、110 $^{\circ}$ C、20 時間反応させ、アミノ酸レベルにまで加水分解を行った。HCl を留去するため、減圧乾燥を行いリン酸緩衝液に再溶解した。抗原抗体反応はペントシジンエライザキット（Human Pentosidine ELISA Kit、CUSABIO、USA）を用いて行い、マイクロプレートリーダー（iMark マイクロプレートリーダー、Bio-rad、CA）を用いて、450nm/570nm の吸光度を計測した。定量は同時に作成した検量線で行い、Mann-Whitney 検定にて有意差の検定を行った。

2.5 高速液体クロマトグラフィーによる AGEs の検出・同定

ELISA と同様に 6M-HCl でアミノ酸レベルまで加水分解を行った齲蝕罹患部と健全部の試料は、HCl の留去のため減圧乾燥を行った後に 50 μ l の水に再溶解し、孔径 0.22 μ l のフィルターでろ過し HPLC 分析に供した。また、本実験では齲蝕に罹患していない歯より採取した健全質を比較対象として用意し、同様の手順で試料とした。ポンプには（PU-4180、日本分光、東京）を使用し、ディテクターには蛍光検出器（F-1050、日立、東京）を用いた。カラムには C18 逆相カラム（COSMOSIL C18 ϕ 2mm-長さ 150mm、ナカライテスク、京都）を用いた。分離用の溶液として初期溶液 A：2 % アセトニトリル-水、0.1%HBFA、分離用溶液 B：50%アセトニトリル、0.1%HFBA で流速 0.2ml/min、試料のロード量は 10 μ l

とし、アセトニトリルを初期 2%から 1.6%/min で 50%まで濃度勾配をかけた。溶出試料に対し、ペントシジン特有の励起波長 335nm、検出波長 385nm で蛍光を検出した。各検出の間は B 液を 10 分間流しカラムに結合しない夾雑物を取り除いた。

2.6 齲蝕罹患象牙質の蛍光特性

他の実験と同様に 1mm 厚の脱灰された齲蝕罹患歯を用意した。蛍光寿命及び蛍光強度の測定は齲蝕罹患部、健全部、境界部(部位類については 2-1 参照)、の 3 か所について、それぞれ 5 回測定を行い、平均に最も近い値を選んだ。また、齲蝕罹患試料の蛍光寿命、蛍光強度マッピングも併せて行った [34]。計測には生体試料用の時間相関単一計測 (TCSPC) 蛍光寿命測定装置を用いて行った。試料の散乱光を抑制するため励起波長 375nm に設定し、蛍光と分けるため 405nm カットフィルターを励起光に挿入した。励起は 5Mhz の間隔で繰り返し測定を行った。 [22]

3 結果

3.1 グラム染色・免疫組織化学染色

グラム染色 (図 1-B) では、象牙質における齲蝕罹患の起点とみられるエナメル象牙境 (図 1-B の右上) から、歯髄側 (図 1-B の下方) に向かって象牙細管に沿うように細菌の侵入を認めた。

免疫組織化学染色 (図 1-C,D) にて同部位を観察したところ、抗 typeI コラーゲン抗体(図

1-C)ではグラム染色で菌の侵入を認めた部位で DAB の弱い染色を認めた。一方で抗 AGEs 抗体を用いた染色(図 1-D)では歯髄側象牙質と象牙細管に沿うように DAB 発色を認めたほか、細菌の侵入を認めた部位の縁に異所性の DAB 発色を認めた。

3.2 免疫電子顕微鏡解析

健全部の弱拡大像(図 2-A)では象牙細管と周囲基質との境界が確認できた。一方、境界部(図 2-B)および齶蝕罹患部(図 2-C)では象牙細管内への細菌の侵入が認められ細管および周囲基質部の形態が不明瞭であることが確認された。象牙細管周囲を強拡大した観察像では、健全部(図 2-D)では象牙細管の周囲近傍にのみ金コロイドの沈着を認めた。境界部(図 2-E)では、象牙細管の辺縁は不明瞭になっており、象牙細管の周囲に健全部に比べて多くの金コロイドが認められたものの、象牙細管から離れた象牙質では分布密度が低かった。齶蝕罹患部(図 2-F)では齶蝕により象牙細管の形態が大きく破壊されており、AGEs の沈着を示す金コロイドの局在も細管周囲のみではなく、象牙質全体に広がっていることが観察された。

3.3 ウェスタンブロット法

本実験では、コラーゲンのコントロールとして calf skin コラーゲンを用い、糖化コラーゲンのコントロールとしては、D-リボースで糖化させた calf skin コラーゲンを使用した。

銀染色像(図 3-A)より象牙質抽出物に含まれる総タンパク量は齶蝕罹患部と健全部と

の間に差を認めず、両者に同量のタンパク質が含まれていることが示された。

コラーゲンに対するウェスタンブロット（図 3-B）では齶蝕罹患部と健全部に関して差を認めなかった。一方で、AGEs(CML) に対するウェスタンブロット（図 3-C）では健全部と比較して齶蝕罹患部において AGEs(CML)が多く存在していることが確認された。

3.4 ELISA

3 本の齶蝕罹患歯（23 歳、24 歳、25 歳）について齶蝕罹患部と健全部の AGEs（ペントシジン）量の検出・定量を行った。図 4 よりいずれの試料においても齶蝕罹患部の方が健全よりも AGEs（ペントシジン）の蓄積が有意に多く認められた。

3.5 高速液体クロマトグラフィー

本実験では標準試料として合成ペントシジン（pentosidine 純度： $\geq 98\%$ 、CaymanChemical、USA）を用い、その保持時間を測定した。図 5 より、齶蝕罹患部、健全部（齶蝕罹患歯）ともに合成ペントシジンとほぼ同一の保持時間 22 分付近に溶出ピークを認めた。また、齶蝕罹患部では健全部（齶蝕罹患歯）と比較して大きなピークであった。健全部（健全歯）においても同様の保持時間を示すピークが認められるが、その高さは健全部（齶蝕罹患歯）と比較して小さかった。

3.6 蛍光強度・蛍光寿命測定

齶蝕罹患部、健全部、両者の境界部から得られた蛍光減衰曲線（図 6）を比較すると健

全部、境界部、齲蝕罹患部の順に蛍光寿命が短くなっていることがわかる。

蛍光寿命マッピングでは脱灰試料全体 (図 7-A,B) の蛍光寿命及び蛍光強度を測定し図 7 齲蝕罹患歯の蛍光マッピングのような結果を得た。蛍光寿命 (図 7-E,F) ではコンターバーが示すように寿命が短いと赤、長いと青くなる。齲蝕罹患歯において、罹患部の蛍光寿命は短くなっていることがわかる。蛍光強度マッピングでは (図 7-C,D) では強度が低いと赤、高くなると青くなるように表示をしている。蛍光寿命と同様に齲蝕罹患部で強度が低下していることがわかる。しかし、蛍光寿命とは異なり歯髄においても低下していることが確認できる。

4 考察

4.1 AGEs の分布

齲蝕の進行においてエナメル質表面に付着した細菌は糖を分解し、酸を産生させることでヒドロキシアパタイトを脱灰させ結果的に齲蝕が象牙質に至る [35]。これにより象牙質内に含まれていたコラーゲンは外界へと露出することになる [36] [37]。齲蝕罹患象牙質では、グラム染色と免疫組織化学染色の結果より、細菌の侵入部位と抗 typeI コラーゲン抗体で発色が弱くなっている部位は、ほぼ一致していることがわかる (図 1)。今回の実験で用いた抗コラーゲン抗体は、コラーゲン蛋白の三重螺旋構造を認識しているため [38]、齲蝕罹患により細菌が侵入した部位ではコラーゲンの立体構造が破壊、あるいは変性したことで抗原として認識しなくなっていると考えられる。

抗 CML 抗体による免疫組織化学染色の結果より、細菌の侵入が認められる部位と健全部との境界部で異所性の発色が認められることから、齲蝕罹患に伴う CML の増加と細菌の侵入の間には何らかの関連があると考えられる (図 1-D)。免疫電子顕微鏡解析の結果から健全部では象牙細管の近傍にのみみられた金コロイドの付着が、管間象牙質まで広く分布するようになっている。これら結果から抗 CML 抗体で異所性の発色を見た理由について、細菌による象牙細管壁の脱灰や酸による基質の分解が象牙細管の形態を不明瞭にし、脱灰に伴って露出したコラーゲンに外因性の糖が作用し糖化反応が起こるのではないかと考えられる (図 8)。なお、歯髄側象牙質や象牙細管が抗 AGEs 抗体で強く発色していることに関しては、血糖由来の糖化が関与していると考えられる [22]。

AGEs の沈着は象牙細管内に細菌が侵入している部位と類似しており、齲蝕の進行に伴う細菌の侵入と AGEs の沈着については今後さらに詳しく調べていく必要がある。

4.2 AGEs の検出・同定

TypeI コラーゲンの抽出について、象牙質はコラーゲン密度が高く、架橋が多いことから、抽出が困難な組織である [39]。象牙質に含まれる type1 コラーゲンは 3 本のポリペプチド鎖 ($\alpha 1$ 鎖 2 本と $\alpha 2$ 鎖 1 本) がらせん状に束ねられて形成している。脱灰された象牙質の分解に高濃度の塩酸を用いた場合、分解時間は短くなるが、コラーゲンの三本鎖構造を無作為に分解してしまう。抗原抗体反応に立体構造を認識する typeI コラーゲン抗体を用いた場合、分解によって反応しなくなると考えられる。それぞれのポリペプチド鎖を認識する

抗体を使用すると、分解された後でも認識することは可能だが、齶蝕細菌などによる分解と見分けることは困難である。

AGEs の抽出について、齶蝕罹患象牙質と健全象牙質で分解程度に差が少ない適切な方法を模索する必要があった。これまでの報告の中で、ペプシンやコラゲナーゼなどの酵素による分解では AGEs の蓄積によって分解時間に差が生じることや、完全に分解することが難しいことが明らかになっている。加水分解酵素への抵抗性についての報告から [40] [41] [42]、分解を妨げる原因としてコラーゲン分子間の非特異的な架橋構造が挙げられる [43] [44]。そこで、本実験では塩酸のモル濃度を変えて分解を行い、齶蝕罹患部と健全部が一定の分解を見せる濃度と時間を求めた。その結果、酵素の場合と同様に齶蝕罹患部の方が分解に時間を要する一方、高濃度では特に健全部が早期に分解が進んでしまい、検出不能となった (図 9)。さらに、低濃度では齶蝕罹患部での分解が遅く採用は困難と考えられた。

抗 typeI コラーゲン抗体が認識できる程度に構造を維持した状態で、さらに抗 AGEs(CML)抗体が抗原を認識できる抽出物を得られるように、同程度の分解が期待できる条件を検索し、1M-HCl で 24 時間反応させる条件を採用することにした。

TypeI コラーゲン抗体でのウェスタンブロット (図 3-B) では健全部と齶蝕罹患部で差が認められなかった。これは齶蝕罹患部ではコラーゲン分子間に架橋構造が形成されているため、塩酸による分解や電気泳動での SDS によって個々のコラーゲン分子には変性が起こるが、分子間架橋構造は維持されるため、PVDF 膜に転写後 SDS が取り除かれると膜上で

コラーゲンの三本鎖構造は復元される現象が起こるためと考えられる [38]。一方でウエスタンブロット法では AGEs(CML)は増加しており、ELISA では齲蝕罹患部で健全部と比較して有意に AGEs (ペントシジン) が増加していたことが確認された。HPLC の結果からも齲蝕罹患部でのピークの大きさが健全部よりも大きかったことから、齲蝕罹患部ペントシジンの増加を認めた。

CML はアミノ残基が存在することで容易に形成されるほか、ヒドロキシルラジカルやペルオキシナイトライトなどの存在により形成が促進される [45]。一方のペントシジンはコラーゲンのリジン残基とアルギニン残基の 2 つの塩基性アミノ酸側鎖がクロスリンクできる位置関係になくしては反応しない [9]。そのため生成量はコラーゲン 1 分子あたり数個と、CML と比較して少ない。CML は加熱処理を行う際に生成されてしまいアーティファクトとして出現する可能性があり、ELISA と HPLC では試料に本来含まれていた CML の定量が困難であると考えられる [46]。CML とペントシジンはその生成過程において糖化とともに酸化を含むことをはじめ、共通した特徴が多いことから、CML もペントシジンと同様に増加していることが示唆される。

齲蝕罹患部では健全部と比較して外来性の糖が多く存在しており、糖と反応する機会が多いことが AGEs(CML,ペントシジン)の増加につながっていると考えられる。ELISA の結果で試料間において AGEs の蓄積量にばらつきがあったことについて、抜歯前の萌出状態や萌出時期、齲蝕罹患の期間など、歯の置かれていた環境の違いや各個体の栄養状態、嗜

好食物、血糖など多くの因子が影響したと考えられる。

加齢に伴い象牙質には AGEs が沈着することから、齲蝕罹患部に限らず健全部においてもペントシジンは検出される。 健全部（健全歯）におけるピークが健全部（齲蝕罹患歯）よりも明らかに小さかったことから、齲蝕罹患歯に残っている健全象牙質においても AGEs（ペントシジン）の蓄積量が増加していると考えられる。これは、エナメル質の喪失により外部の影響を受け細管内液の流量や組成の変化が起こり、結果として齲蝕に関連して感染の起こっていない健全象牙質においても糖化反応が起こっているからと考えられる。なお本実験で用いた健全部（健全歯）は健全部（齲蝕罹患歯）とは別個体より採取した歯であるため、個体間による AGEs（ペントシジン）蓄積の差である可能性を棄却できない。

予備実験において、齲蝕罹患部において分解が遅くなった原因が、架橋型 AGEs による分解抵抗性であるとする、加齢により AGEs が多く蓄積した歯では齲蝕の進行が遅くなると考えられる。主に高齢者にみられる進行が緩慢である慢性齲蝕の原因として現在、加齢に伴う象牙細管の閉塞や石灰化の亢進などが指摘されているが [47] [48]、AGEs による架橋構造もまた、慢性齲蝕の成因の一つではないかと考えられ、今後さらに研究を深めていく必要がある。

4.3 齲蝕罹患象牙質の蛍光特性

齲蝕罹患部では健全部と比較して蛍光寿命の短縮が認められた。糖化修飾されたコラーゲンは AGEs の蓄積量に依存して蛍光寿命の短縮、蛍光強度の減弱が起こる [49]。これは、

架橋型 AGEs であるペントシジンがコラーゲンよりも短い蛍光寿命を持っているためである [22]。そのため、健全から境界部、齲蝕罹患部と移るにしたがって AGEs (ペントシジン) の蓄積量が増加していると考えられる。

蛍光寿命マッピングにおいて、蛍光寿命が短くなっている部位が齲蝕罹患部とほぼ一致した (図 7-E,F)。また、健全歯における加齢に伴う AGEs の蓄積は歯髄に含まれる糖に由来すると考えられるが [22]、齲蝕罹患歯においては、齲蝕の象牙質内進行への起点と思われるエナメル象牙境で最も蛍光寿命が短くなっており、そこから歯髄側へ向かうにしたがって蛍光寿命が長くなっているのがわかる。つまり齲蝕罹患部における糖化はエナメル象牙境から進行していったと考えられる。蛍光寿命は蛍光物質がそれぞれ特有の値を持っている。そのため、齲蝕罹患部では蛍光寿命の短い AGEs が増加したと考えられる。

蛍光強度マッピングでは、齲蝕罹患部での強度が弱くなっていることがわかる (図 7-C,D)。齲蝕罹患部と健全部の境界では、細菌の代謝物質などの蛍光分子が蓄積することで蛍光強度が強くなるという報告があるが [50]、本実験においてはそのような傾向は認められなかった。これは蛍光強度が試料の表面性状や入射光強度、測定方法の違いなどにより値が変化するためと考えられる。

蛍光強度は蛍光物質の量に大きく依存し、象牙質においては AGEs だけでなく他の蛍光物質の影響も受ける。蛍光強度が弱くなったことは、AGEs の蓄積よりもコラーゲンの破壊による減少がその要因と考えられる。同様に歯髄においてもコラーゲンが少ないため、蛍

光強度は低くなったと考えられる。また、蛍光強度は蛍光寿命とは違い、試料の表面性状や色調などの影響を受けるため、齲蝕罹患部のように黒変していることが強度へ影響している可能性もある。

4.4 今後の展望

前述のように蛍光寿命は物質に特有の値を示し、コラーゲンよりも蛍光寿命の短い AGEs の沈着によって蛍光寿命は短くなる。AGEs の沈着部位と齲蝕の進行部位に関連性が見られることから AGEs の沈着を見ることで齲蝕の進行の一つのマーカーとして利用できるのではないかと考えられる。現在、齲蝕罹患部位に特定にはプロピレングリコールなどを用いて多孔性を示す齲蝕罹患部のコラーゲンを染色する方法や、665nm のパルス光を歯質に作用させ、齲蝕細菌の代謝物などに吸収されると赤色の蛍光を発する現象を利用したものなどがあるが、これらの特徴として凹凸や色調といった表面性状に左右されるという問題点がある。一方、AGEs の蛍光寿命を用いる方法は、象牙質コラーゲンの質的要素を見ているため、入射光の強度や試料の表面性状に依存しない。齲蝕の除去指標の 1 つとして利用できるのではないかと考えられる。しかし、他の方法と同様に深部の齲蝕や修復物の下にできているものについてはアプローチが困難である。現在プローブ型の検出チップを作成しており、臨床への応用が可能か準備を行っているところである。

最後に、本実験に用いた齲蝕罹患歯は、若年者（30 歳未満）の歯を使用した。これは加齢による AGEs の蓄積を減らすためだが、口腔内の状態はもとより全身の状態によって

も蓄積量は変化することから、齲蝕罹患からの経過時間や健康状態も影響すると考えられる。また、齲蝕に罹患している歯と齲蝕に罹患していない歯の健全象牙質においても AGEs の蓄積に大きな変化が見られた。今後はこれらの点も考慮して、臨床応用や全身疾患との関連、感染細菌叢による糖化修飾違いなど、さらに研究を進めていきたい。

5 結論

齲蝕罹患に伴い象牙質では AGEs が蓄積する。その分布は、エナメル象牙境より歯髄へ向かって象牙細管に沿うように蓄積しており、特に細菌の侵入の多いエナメル象牙境付近の齲蝕罹患象牙質では、管間象牙質にまで AGEs の蓄積を認めた。

AGEs の蓄積は、健全部においても加齢とともに起こるが、齲蝕罹患によって蓄積量が増加する。特に、架橋型 AGEs の一つであるペントシジンが齲蝕罹患によって有意に増加していることが明らかとなった。

齲蝕罹患部の蛍光寿命の短縮が認められたことから、齲蝕罹患により蛍光寿命が周囲基質より短時間である AGEs が増加していることが考えられる。

6 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 竹重文雄教授および三浦治郎博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なるご指導とご協力を賜りました大阪大学基礎工学研究科生体計測学研究室の荒木勉教授に心より感謝申しあげます。さらに、実験方法の示唆や、研究機器使用の機会を与えて下さいました、大阪大学歯学研究科口腔科学フロンティアセンター 吉良新太郎博士、大阪大学歯学部附属病院第二口腔外科の諸先生方に深謝いたします。

最後に、本研究に種々の御配慮、御援助、御助言を頂いた口腔総合診療学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

7 参考文献

- [1] 浜田茂幸、大嶋隆, 新・齲蝕の科学, 医歯薬出版, 2006.
- [2] 厚生労働省, “平成 23 年度歯科疾患実態調査,” 2011.
- [3] W. Miller, "The Human Mouth as a Focus of Infection.," *Dental Cosmos* 33(9), Sep. 1891:689-706.
- [4] G. Joves, G. Inoue, A. Sadr, T. Nikaido and J. Tagami, "Nanoindentation hardness of intertubular dentin in sound, demineralized and natural caries-affected dentin," *J. Mechanical behavior of biomedical materials*, 2014:32:39:45.
- [5] O. Fejerskov, "Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: *Consequences for Oral Health Care*," *Caries Res*, 2004;38:182–191.
- [6] L. Maillard, "Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique.," *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 1912:154,66-68.
- [7] S. Thorpe and J. Baynes, "Maillard reaction products in tissue proteins : new products and new perspectives.," *Amino Acids*, 2003:25:275-281.
- [8] G. Vistoli, D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini and G. Aldini, "Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation.," *Free Radic Res.*, 2013:47:3-27.
- [9] D. Sell and V. Monnier, "Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix.," *J Biol Chem*, 1989:264:21597-21602.
- [10] M. Ahmed, S. Thorpe and J. Baynes, "Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein.," *J Biol Chem.*, 1986:261:4889-4894.
- [11] M. Saito, "Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Bone collagen metabolism: new biological markers for estimation of bone quality," *Clin Calcium*, 2009:19:1110-1117.
- [12] Y. Okano, H. Masaki and H. Sakurai, "Dysfunction of dermal fibroblasts induced by advanced glycation end-products (AGEs) and the contribution of a nonspecific interaction with cell membrane and AGEs.," *Journal of Dermatological Science*, 2002:29:171-180.
- [13] M. Saito and K. Marumo, "Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus.," *Osteoporos Int.*, 2010:21:195-214.

- [14] S. Tang, U. Zeenath and D. Vashishth, "Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility," *Bone*, 2007;40:1144-1151.
- [15] R. Nagai, T. Mori, Y. Yamamoto, Y. Kaji and Y. Yonei, "Significance of Advanced Glycation End Products in Aging Related Disease," *Am J Med*, 2010;122:793-802.
- [16] T. Miyata, N. Ishiguro, Y. Yasuda, T. Ito, M. Nangaku, H. Iwata and K. Kurokawa, "Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998;244:45-49.
- [17] R. Koenig, C. Peterson, C. Kilo, A. Cerami and J. Williamson, "Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes," *Diabetes*, 1976;25:230-232.
- [18] R. Koenig, C. Peterson, R. Jones, C. Saudek, M. Lehrman and A. Cerami, "Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus," *N. Engl. J. Med.*, 1976;295:417-420.
- [19] M. Smity, S. Taneda, P. Richey, S. Miyata, S. Yan, D. Stern, L. Sayre, V. Monnier and G. Perry, "Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994;91:5710-5714.
- [20] Y. Nakajima, Y. Inagaki, Y. Hiroshima, J. Kido and T. Nagata, "Advanced glycation end-products enhance calcification in cultured rat dental pulp cells," *J. Endod.*, 2013;39:873-878.
- [21] M. Kubo, J. Miura, T. Sakata, R. Nishi and F. Takeshige, "Structural modifications of dentinal microcracks with human aging," *Microscopy*, 2013;62:(6)555-561.
- [22] S. Fukushima, M. Shimizu, J. Miura, Y. Matsuda, M. Kubo, M. Hashimoto, T. Aoki, F. Takeshige and T. Araki, "Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin," *Biomed. Opt. Express*, 2015;6:1844-1856.
- [23] G. Kleter, J. Damen, M. Buijs and J. Ten Cate, "The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro," *European Journal of Oral Sciences*, 1997;105-278-284.
- [24] G. Kleter, "Discoloration of dental caries lesions (a review)," *Archives of oral biology*, 1998;43:629-632.
- [25] J. Miura, K. Nishikawa, M. Kubo, S. Fukushima, M. Hashimoto, F. Takeshige and

- T. Araki, "Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine.," *Arch. Oral Biol.*, 2014:59:119-124.
- [26] C. Walters and D. Eyre, "Collagen crosslinks in human dentin: Increasing content of hydroxypyridinium residues with age.," *Calcif. Tissue Int.*, 1983:35:401-405.
- [27] R. Longin, "New method of collagen extraction for Radiocarbon Dating.," *nature*, 1971:230:241-242.
- [28] F. Maspero, S. Sala, M. Fedi, M. Martini and A. Papagni, "A new procedure for extraction of collagen from modern and archaeological bones for ^{14}C dating.," *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011:401:2019-2023.
- [29] A. Sagar and M. Pandit, "Denaturation studies on bovine pancreatic ribonuclease. Effect of trichloroacetic acid.," *Biochim Biophys Acta.*, 1983:743:303-309.
- [30] U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, 1970:227:680-685.
- [31] B. Oakley, D. Kirsch and N. Morris, "A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.," *Anal. Biochem.*, 1980:105:361-363.
- [32] M. Lauriere, "A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE.," *Anal. Biochem.*, 1993:212:206-211.
- [33] J. Stephano, M. Gould and L. Rojas-Galicia, "Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels.," *Anal. Biochem.*, 1986:152:308-313.
- [34] S. Fukushima, T. Yasui, T. Iwata and T. Araki, "レーザー誘起ナノ秒蛍光寿命マッピングによる歯の形成と老化の可視化," *生体医光学*, 2006:44:702-706.
- [35] T. Aoba, "The effect of fluoride on apatite structure and growth," *Crit Rev Oral Dent Med*, 1997:8:136-153.
- [36] D. Boston and H. Graver, "Histological study of an acid red caries-disclosing dye," *Oper Dent*, 1989:14:186-192.
- [37] W. Arnold, S. Konopka and P. Gaengler, "Qualitative and Quantitative Assessment of Intratubular Dentin Formation in Human Natural Caries Lesions," *Calcified Tissue International*, 2001:69:268-273.
- [38] S. Hazra, S. Xiong, J. Wang, R. Rippe, V. Krishna, K. Chatterjee and H. Tsukamoto, "Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Induces a Phenotypic Switch from Activated to Quiescent Hepatic," *J. Biol. Chem*, 2004:279:11392-11401.
- [39] P. Fratzl, "Collagen: Structure and Mechanics.," *Technology and Engineering, Springer Science*, Berlin., 2008.

- [40] G. Kleter, J. Damen, M. Buijs and J. Ten Cate, "Modification of Amino Acid Residues in Carious Dentin Matrix.," *J.Dent.Res.*, 1998:77:488-495.
- [41] C. Vater, E. J. Harris and R. Siegel, "Native cross-links in collagen fibrils induce resistance to human synovial collagenase.," *Biochem J.*, 1979:181:639-45.
- [42] D. Carmichael, C. Dodd and A. Veis, "The solubilization of bone and dentin collagens by pepsin. Effect of cross-linkages and non-collagen components.," *Biochim Biophys Acta.*, 1977:491:177-92.
- [43] S. Schnider and R. Kohn, "Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen.," *J Clin Invest.*, 1981:67:1630-1635.
- [44] M. Francis-Sedlak, S. Uriel, J. Larson, H. Greisler, D. Venerus and E. Brey, "Characterization of type I collagen gels modified by glycation.," *Biomaterials*, 2009:30:1851-1856.
- [45] R. Nagai, Y. Unno, M. Hayashi, S. Masuda, F. Hayase, N. Kinae and S. Horiuchi, "Peroxynitrite induces formation of N-(carboxymethyl)lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose.," *Diabetes*, 2002:51:2833-2839.
- [46] M. Nakano, M. Kubota, S. Owada and R. Nagai, "The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating.," *Amino Acids*, 2013:44:1451-1456.
- [47] J. Tagami, H. Hosoda, M. Burrow and M. Nakajima, "Effect of aging and caries on dentin permeability.," *Proc Finn Dent Soc.*, 1992:88:149-154.
- [48] S. Gaiser, H. Deyhle, O. Bunk, S. White and B. Muller, "Understanding nano-anatomy of healthy and carious human teeth: a prerequisite for nanodentistry.," *Biointerphases*, 2012:7:4.
- [49] P. Odetti, A. Borgoglio and R. Rolandi, "Age-Related Increase of Collagen Fluorescence in Human Subcutaneous Tissue," *Metabolism*, 1992:41:655-658.
- [50] P. Lin, H. Lyu, C. Hsu, C. Chang and F. Kao, "Imaging carious dental tissues with multiphoton fluorescence imaging microscopy," *Biomedical Optics Express*, 2011:2:149-152.

8 図表

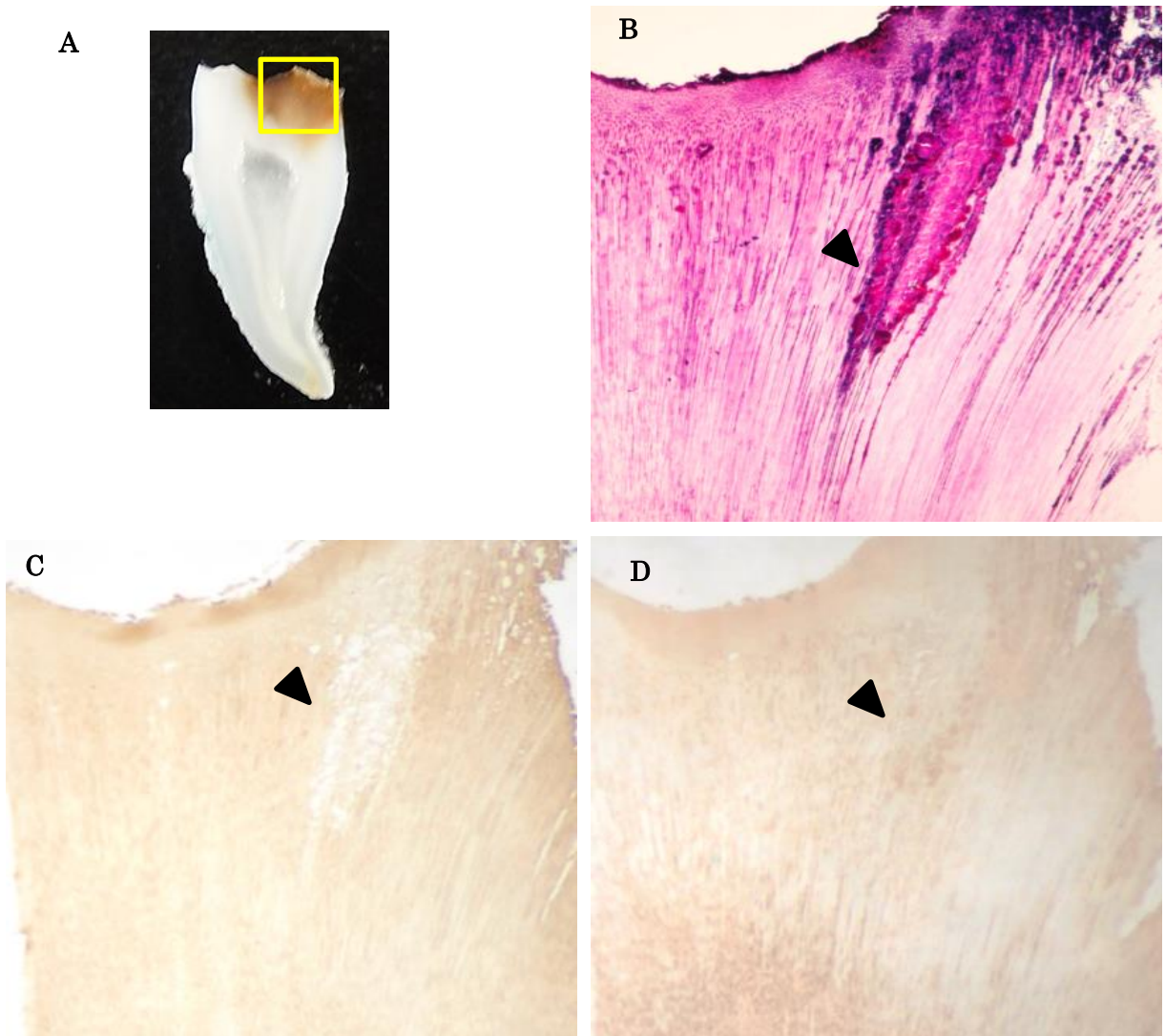


図 1 使用した齲蝕罹患歯とグラム染色、免疫組織化学染色

(A) 齲蝕に罹患した歯を抜歯後、1mm 厚に切り脱灰した

(B) グラム染色：象牙細管の走行に沿う形で細菌の侵入を認める（矢印）

(C) 抗コラーゲン抗体による免疫組織化学染色：弱染部（矢印）

(D) 抗 AGEs(CML)抗体による免疫組織化学染色：強染部（矢印）

(B)~(D)は連続切片で観察を行った

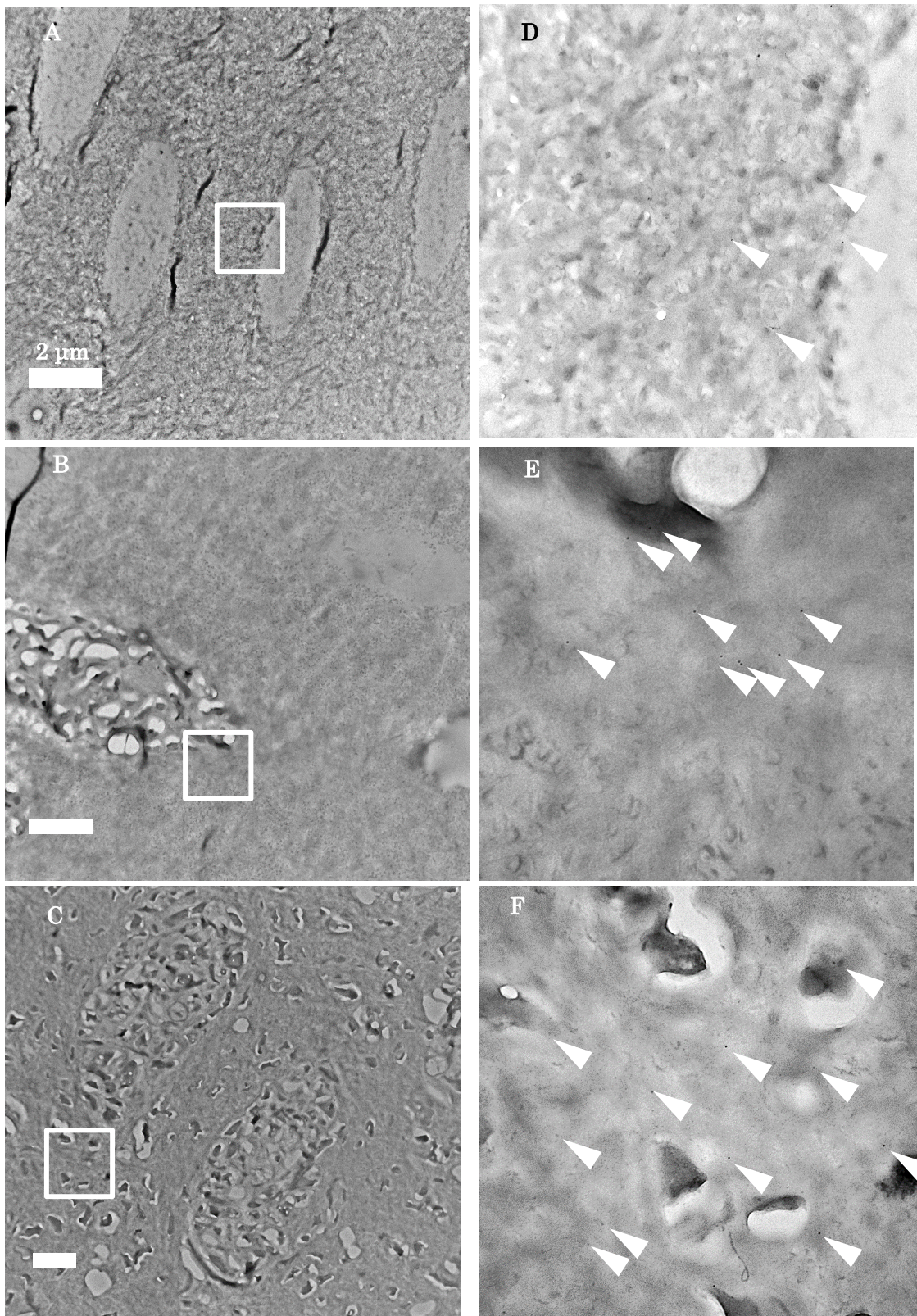


図 2 抗 AGEs(CML)抗体による免疫電子顕微鏡解析
 (A)(D) : 健全部、(B)(E) : 境界部、(C)(F) : 齧蝕罹患部
 (A)~(C) : 弱拡大、(D)~(F) : 強拡大 (白四角の部分)
 白矢印 : 金コロイド

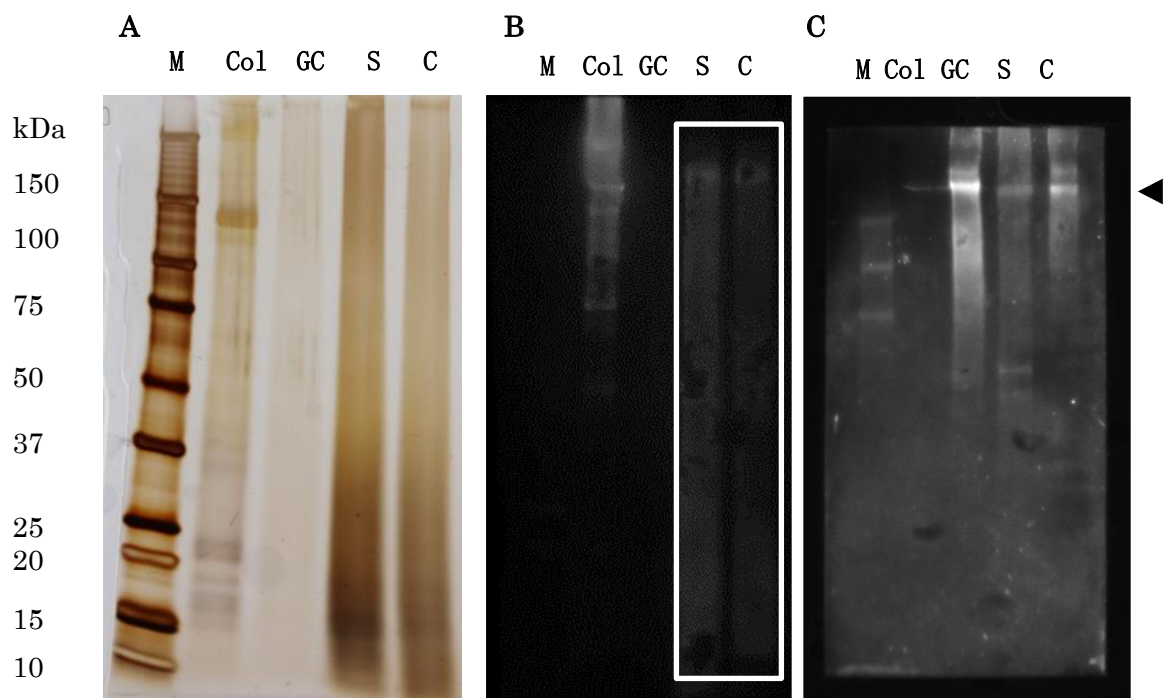


図 3 銀染色、ウェスタンブロット

M:分子量マーカー、Col : Calf skin コラーゲン、

GC : リボース糖化 Calf skin コラーゲン、S : 健全部、C : 齲蝕罹患部

(A) 銀染色 (総抽出タンパク質の検出)

(B) 抗コラーゲン抗体によるウェスタンブロット

(C) 抗 AGEs(CML)抗体によるウェスタンブロット

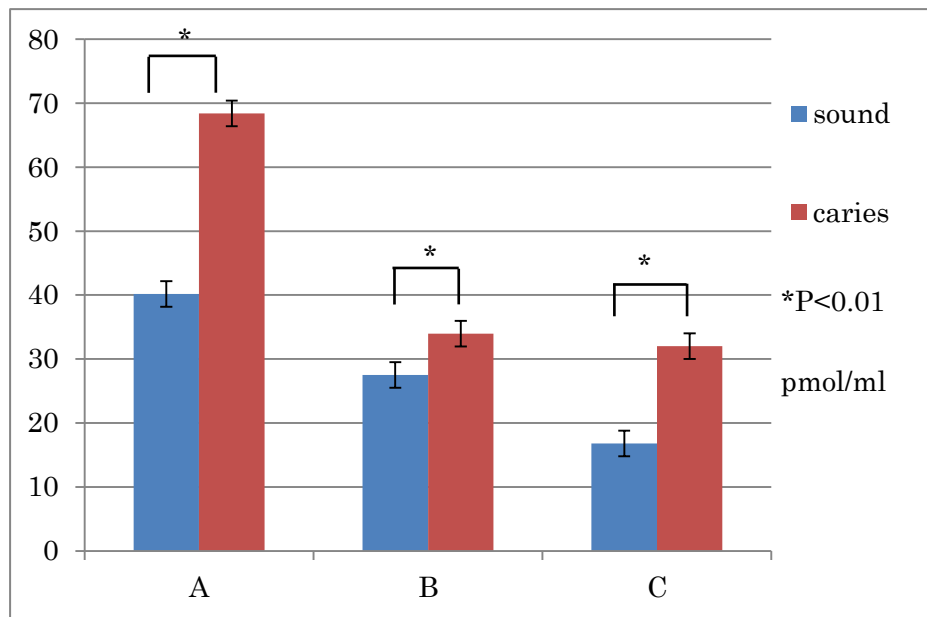


図 4 ELISA による AGEs(pentosidine)蓄積量の比較

若年者の齲蝕罹患歯(3 本)から健全部と齲蝕罹患部を採取し、それぞれに含まれているペントシジン量を比較した

青：健全部、赤：齲蝕罹患部

A：23 歳（3 か所）、B：24 歳（2 か所）、C：25 歳（3 か所）

Mann-Whitney U test, $P < 0.01$ (*)

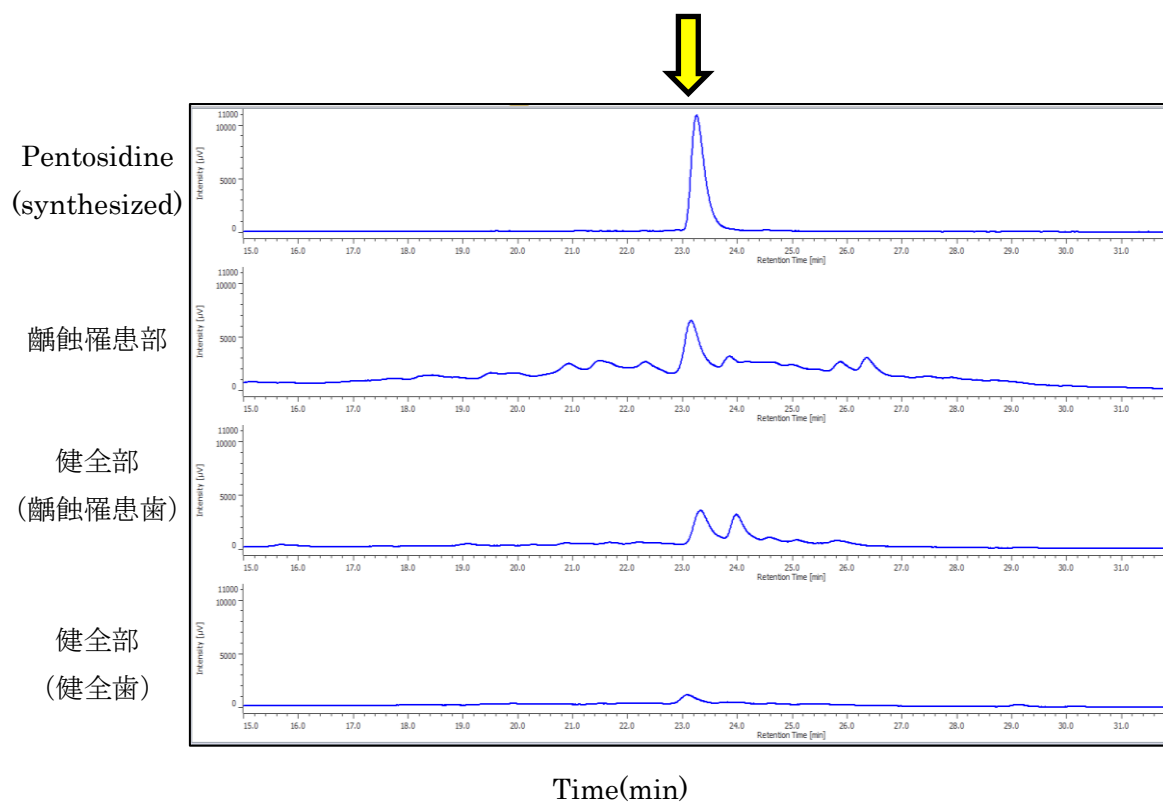


図 5 高速液体クロマトグラフィー法による検出

カラム : Cosmosil®C₁₈(φ 2mm×150mm)

SolventA : 2%アセトニトリル、0.1%HBFA

SolventB : 50%アセトニトリル、0.1%HFBA

グラディエント : 1.6%/min、流速 : 0.2ml/min

蛍光検出条件 : Ex : 335nm、Em : 385nm

Pentosidine(synthesized) : ペントシジン標品 (化学合成品)

齲蝕罹患部 : 齲蝕罹患歯における齲蝕罹患部

健全部 (齲蝕罹患歯) : 齲蝕罹患歯における健全部

健全部 (健全歯) : 健全歯における健全部

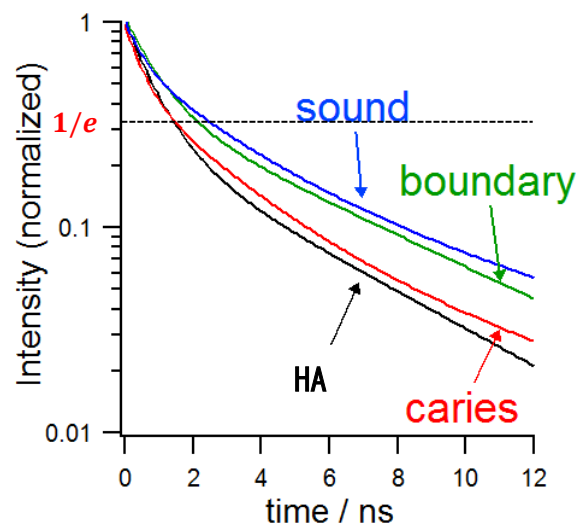


図 6 齲蝕罹患歯の蛍光減衰曲線

Sound : 健全部、boundary : 境界部、caries : 齲蝕罹患部

HA : ヒドロキシアパタイト

齲蝕罹患部での蛍光寿命の短縮が認められた

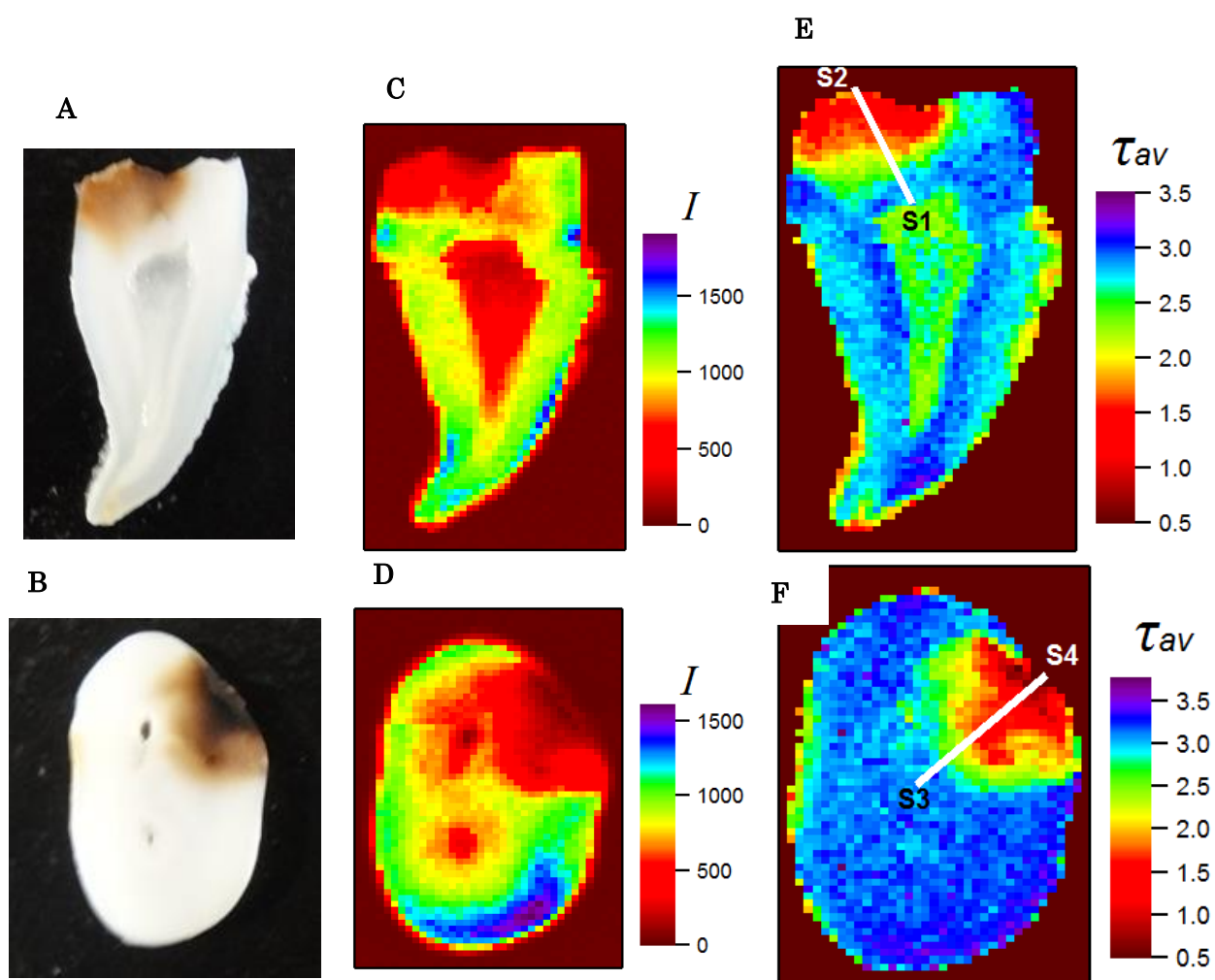


図 7 齲蝕罹患歯の蛍光マッピング

(A)(B) : 使用した齲蝕罹患歯 (罹患部は黒褐色に変色している)

(C)(D) : 蛍光強度マッピング

(E)(F) : 蛍光寿命マッピング

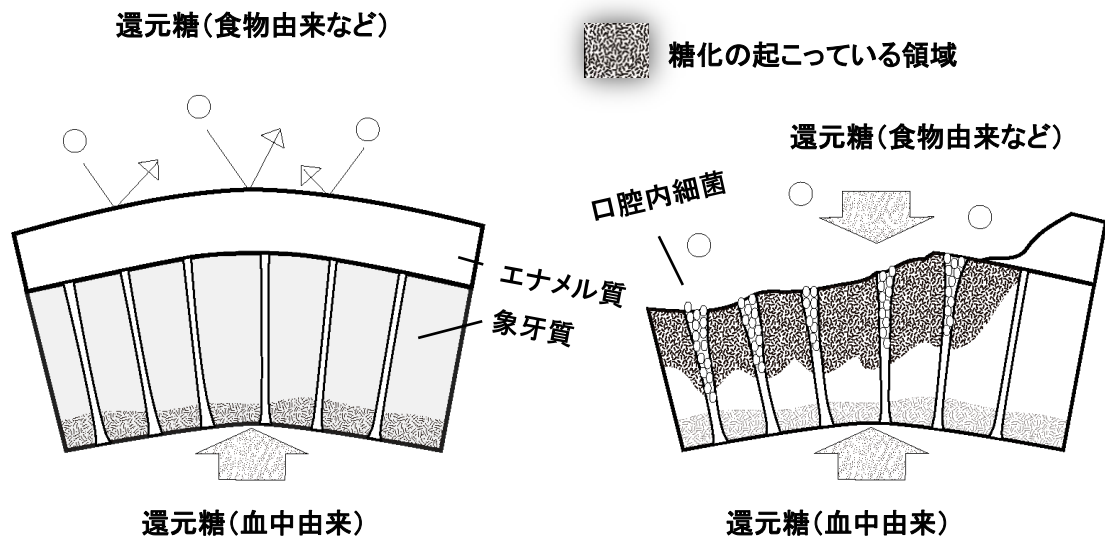


図 8 齲蝕による AGEs 沈着のイメージ

左：健全歯における糖化。エナメル質が象牙質を覆っているため細菌を含め還元糖との接触が起こらない。そのため糖化は歯髄側より起こる。

右：齲蝕罹患歯における糖化。エナメル質が破壊され象牙質が暴露しているため、象牙細管への細菌の侵入をはじめ、食物由来の還元糖などによる糖化が破壊が進んでいるエナメル象牙境より起こる。

M Col GC S1 C1 S3 C3 S6 C6

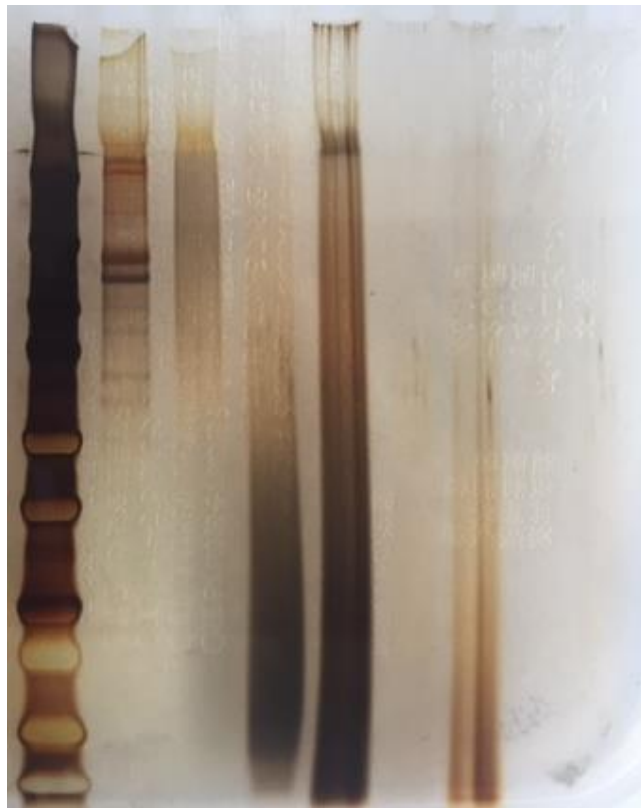


図 9 塩酸による分解の比較

M:分子量マーカー、Col : Calf skin コラーゲン、

GC : リボース糖化 Calf skin コラーゲン

S1,3,6 : 健全部、C1,3,6 : 齧蝕罹患部、数字は塩酸のモル濃度

分解時間 : 48 時間

塩酸の濃度の上昇に伴い分解が進んでいることがわかる。また、齧蝕罹患部の方が健全部と比較して分子量が高いところにタンパク質が残っていることがわかる